



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04100462.3

REC'D 14 FEB 2005

WIPO

PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 04100462.3
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 09.02.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Philips Intellectual Property & Standards
GmbH
Steindamm 94
20099 Hamburg
ALLEMAGNE
Koninklijke Philips Electronics N.V.
Groenewoudseweg 1
5621 BA Eindhoven
PAYS-BAS

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Fluoreszenz-Mikroskopiereinrichtung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

G02B21/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI

BESCHREIBUNG

Fluoreszenz-Mikroskopiereinrichtung

- 5 Die Erfindung betrifft eine Mikroskopiereinrichtung mit einem Fluoreszenzmikroskop zur Abbildung der Verteilung eines Fluoreszenzmarkers in einer Probe. Ferner betrifft sie ein Verfahren zur Ermittlung der räumlichen Verteilung eines Fluoreszenzmarkers in einer Probe.
- 10 Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird mit einem dafür eingerichteten Mikroskop die Verteilung eines Fluoreszenzmarkers in einer Probe beobachtet. Ein Fluoreszenzmarker ist ein chemischer Stoff, welcher nach Anregung mit geeigneter Primärstrahlung Fluoreszenzlicht eines charakteristischen Wellenlängenbereiches aussendet, weshalb für ihn oft auch die Bezeichnung "Fluoreszenz-Farbstoff" verwendet wird. Durch Kopplung
- 15 eines Fluoreszenzmarkers an andere Moleküle wie Medikamente oder Proteine können zum Beispiel Informationen über metabolische Prozesse in biologischen Systemen gewonnen werden. Das mit derzeitigen Fluoreszenzmikroskopen erreichbare Auflösungsvermögen ist allerdings auf einen Bereich von ca. 100 nm bis 30 nm begrenzt, so dass die Beobachtung von kleineren Strukturen oder von Vorgängen auf
- 20 molekularer Ebene nicht möglich ist.

Vor diesem Hintergrund war es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel zur Verbesserung des Auflösungsvermögens bei der Fluoreszenzmikroskopie in klaren bzw. trüben Medien bereitzustellen.

25

Diese Aufgabe wird durch eine Mikroskopiereinrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 sowie durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 5 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen enthalten.

Die erfindungsgemäße Mikroskopiereinrichtung dient der Abbildung einer (z.B. biologischen) Probe, welche einen Fluoreszenzmarker enthält. Dabei soll es sich um einen Fluoreszenzmarker handeln, welcher magnetisch und/oder elektrisch sensitiv ist, bei dem also das Fluoreszenzverhalten (Fluoreszenzintensität, spektrale Verschiebungen der Fluoreszenz, Polarisierung, Zeitverlauf der Intensität etc.) des Markers durch ein
5 externes magnetisches oder elektrisches Feld beeinflusst wird. Die Mikroskopiereinrichtung enthält die folgenden Komponenten:

- 10 - Ein Fluoreszenzmikroskop zur Anregung und Abbildung von Fluoreszenzstrahlung aus der Probe. Geeignete Mikroskope für diesen Zweck sind aus dem Gebiet der Fluoreszenzmikroskopie bekannt.
- 15 - Einen Feldgenerator zur Erzeugung eines räumlich inhomogenen magnetischen und/oder eines räumlich inhomogenen elektrischen Feldes in der Probe, wobei die Inhomogenität des Feldes zumindest in einem lokalen Bereich vorhanden sein muss.

Mit der beschriebenen Mikroskopiereinrichtung ist es möglich, mehr Informationen aus der Beobachtung einer Probe zu gewinnen als bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie. Dies liegt daran, dass in der Probe ein räumlich inhomogenes Feld erzeugt werden kann, welches sich voraussetzungsgemäß auf das Emissionsverhalten des zu beobachtenden Fluoreszenzmarkers auswirkt. Durch das Feld hat der Anwender somit die Möglichkeit, gezielt die lokalen Bedingungen innerhalb der Probe zu variieren und damit Einfluss auf die Fluoreszenz zu nehmen. Insbesondere kann auf diese Weise das
25 Auflösungsvermögen der Mikroskopiereinrichtung in Bezug auf die Fluoreszenzstrahlung verbessert werden, wobei im Folgenden spezielle Anwendungen der Einrichtung detaillierter beschrieben werden. Ferner ist es mit der Mikroskopiereinrichtung möglich, auch Untersuchungen in trüben Medien mit verbessertem Auflösungsvermögen durchzuführen.

Gemäß einer ersten bevorzugten Ausführungsform ist die Mikroskopiereinrichtung dazu eingerichtet, das inhomogene magnetische und/oder elektrische Feld innerhalb der Probe in definierter Weise zu verändern, z.B. seine Lage zu verschieben und/oder seinen Verlauf zu ändern. Durch die Beobachtung, wie ein bestimmtes Probenvolumen auf die Veränderung des Feldes reagiert, können wichtige Informationen über den darin enthaltenen Fluoreszenzmarker gewonnen werden. Wenn beispielsweise das Feld einen kleinen Fokusbereich mit besonderen Bedingungen (z.B. einem Minimum der Feldstärke) aufweist, kann hiermit gezielt an verschiedenen Punkten innerhalb der Probe die Anwesenheit des Fluoreszenzmarkers untersucht werden.

10

Für die Ausbildung eines Feldgenerators mit den gewünschten Eigenschaften gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum Teil kann diesbezüglich auf Lösungen zurückgegriffen werden, die für andere Anwendungen wie beispielsweise die Abbildung von magnetischen Partikeln bekannt sind (vgl. DE 101 51 778 A1, welche durch Bezugnahme vollumfänglich in die vorliegende Anmeldung aufgenommen wird). Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weist der Feldgenerator einen ersten Polkörper mit einer ersten Polarität auf (bei magnetischen Feldern zum Beispiel "Nord", bei elektrischen Feldern zum Beispiel "negativ"), welcher an mindestens zwei aneinander gegenüberliegenden Seiten zweiten Polkörpern der anderen Polarität ("Süd" bzw. "positiv") benachbart ist. Vorzugsweise weist der erste Polkörper eine Spitze auf. Wie im Rahmen der Figurenbeschreibung näher erläutert wird, ergibt sich bei einer derartigen Konstellation in der Regel ein punktförmiger Bereich in der Nähe des Feldgenerators, an welchem die Feldstärke ein Minimum annimmt. Dieser ist dann als ein Fokusbereich bei der Beobachtung einer Probe geeignet.

25

Die mit dem magnetischen oder elektrischen Feld erzeugten Veränderungen im Fluoreszenzverhalten in der Probe können im einfachsten Fall allein mit dem Auge vom Anwender der Mikroskopiereinrichtung beobachtet werden. Vorzugsweise findet indes eine fortgeschrittene Bildverarbeitung der mit dem Fluoreszenzmikroskop

- aufgenommenen Abbildung mit Hilfe einer Datenverarbeitungseinrichtung statt. Die Datenverarbeitungseinrichtung ist diesbezüglich dazu eingerichtet, aus dem bekannten Verlauf des (räumlich und gegebenenfalls auch zeitlich) inhomogenen Feldes während einer oder mehrerer Aufnahmen und der gemessenen Fluoreszenzstrahlung die
- 5 Verteilung des Fluoreszenzmarkers in der Probe zu rekonstruieren. Wenn beispielsweise das Feld einen Fokusbereich minimaler Feldstärke aufweist, kann die Datenverarbeitungseinrichtung berücksichtigen, dass die Fluoreszenz in diesem Bereich entsprechend verändert (verstärkt oder reduziert) ist.
- 10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Ermittlung der räumlichen Verteilung eines magnetisch und/oder elektrisch sensitiven Fluoreszenzmarkers in einer Probe, welches die folgenden Schritte umfasst:
- Die Erzeugung eines zeitlich statischen oder veränderlichen, inhomogenen magnetischen und/oder inhomogenen elektrischen Feldes in der Probe, so dass
15 der Fluoreszenzmarker lokal unterschiedliche Bedingungen vorfindet.
 - Die Anregung von Fluoreszenzstrahlung in der Probe, z.B. durch
20 Primärstrahlung einer geeigneten Quantenenergie.
 - Die Erzeugung mindestens einer optischen Abbildung der aus der Probe kommenden Fluoreszenzstrahlung.
 - 25 - Die Berechnung der räumlichen Verteilung des Fluoreszenzmarkers mit Hilfe der mindestens einen vorstehend genannten Abbildung und mit Hilfe des bekannten zugehörigen Verlaufs des inhomogenen Feldes. Vorzugsweise liegen der Berechnung mindestens zwei Abbildungen bei räumlich unterschiedlichen Feldverläufen zugrunde. Wenn die Feldverläufe so sind, dass sie jeweils die

Untersuchung eines punktförmigen Bereiches bzw. Pixels/Voxels erlauben, benötigt man in der Regel N verschiedene Feldverläufe für die Darstellung von N Pixeln/Voxeln.

- 5 Das Verfahren betrifft in allgemeiner Weise die mit einer Mikroskopiereinrichtung der oben beschriebenen Art ausführbaren Schritte. In Bezug auf Einzelheiten, Vorteile und Weiterbildungen des Verfahrens wird daher insbesondere auf die obige Beschreibung Bezug genommen. Das Verfahren ermöglicht die Gewinnung von Informationen aus der Probe mit hoher örtlicher Auflösung, indem durch ein räumlich inhomogenes Feld und
10 die Verwendung eines hierfür sensitiven Fluoreszenzmarkers die Bedingungen der Fluoreszenz innerhalb der Probe lokal variiert werden.

- Wenn bei dem Verfahren ein inhomogenes magnetisches Feld verwendet wird, hat dieses (an mindestens einem Punkt) vorzugsweise einen Gradienten von mindestens
15 10^2 T/m, besonders bevorzugt von mindestens 10^3 T/m, ganz besonders bevorzugt von mindestens 10^6 T/m. Bei derartigen Werten des Gradienten ändert sich die magnetische Feldstärke pro Nanometer um ca. 0.1 bis 1 mT, wobei bekannte magnetisch sensitive Fluoreszenzmarker auf derartige Änderungen bereits reagieren. Bei den genannten
20 Gradienten kann somit ein räumliches Auflösungsvermögen im Bereich von 1 nm erreicht werden.

- Wenn bei dem Verfahren ein inhomogenes elektrisches Feld verwendet wird, hat dieses (an mindestens einem Punkt) vorzugsweise einen Gradienten von mindestens
25 10^{11} V/m², besonders bevorzugt von mindestens 10^{15} V/m². Bei diesen Werten und der Verwendung üblicher elektrisch sensibler Fluoreszenzmarker ergibt sich ebenfalls ein Auflösungsvermögen im Nanometerbereich.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist das inhomogene Feld so ausgebildet, dass es ein lokales Minimum der Feldstärke hat. Insbesondere kann dieses Minimum den Wert Null haben, also einem feldfreien Bereich entsprechen.

Vorzugsweise ist die Breite des lokalen Minimums kleiner als das optische

- 5 Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskops. Dabei wird die "Breite" des Minimums sinnvollerweise in Abhängigkeit von der Wirkung des Feldes auf den betrachteten Fluoreszenzmarker definiert. Wenn Letzterer z.B. bei verschwindendem Feld eine minimale Fluoreszenzausbeute hat, die mit wachsendem Feld bis zu einem Maximalwert zunimmt, kann die "Breite" als der Bereich mit einer Fluoreszenzausbeute
- 10 unter einem bestimmten Prozentsatz (z.B. 50%) des Maximalwertes definiert werden. Im räumlich eng begrenzten Bereich des lokalen Minimums werden somit besondere Bedingungen für die Fluoreszenz geschaffen, die zu beobachtbaren Auswirkungen in der aus der Probe emittierten Fluoreszenzstrahlung führen. Das Minimum kann daher als Fokusbereich zur gezielten Untersuchung kleiner Volumina innerhalb der Probe
- 15 verwendet werden.

- Gemäß einer anderen Weiterbildung des Verfahrens befindet sich die Probe während ihrer Untersuchung in einer Lösung, welche den Fluoreszenzmarker enthält. Auf diese Weise wird z.B. durch ein Ausbleichen verbrauchter und/oder abgebauter Fluoreszenz-
- 20 marker ständig aus der Lösung neu ersetzt, so dass die Fluoreszenz in der Probe über eine verhältnismäßig große Zeitdauer aufrecht erhalten werden kann.

- Im Folgenden wird die Erfindung mit Hilfe der Figur beispielhaft erläutert. Die einzige Figur zeigt schematisch das Prinzip der erfindungsgemäßen Mikroskopiereinrichtung
- 25 und ihrer Verwendung.

Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie geht es darum, die Verteilung eines Fluoreszenzmarkers 21 innerhalb einer Probe 20 zu ermitteln, wobei diese Verteilung zum Beispiel bei biologischen Proben Auskunft über anatomische und/oder

metabolische Verhältnisse geben kann. Geeignete Fluoreszenzmikroskope finden sich beispielsweise in der Serie LSM 510 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Zur Anregung der Fluoreszenz wird die Probe 20 mit (Primär-)Photonen ν_E bestrahlt, welche von den Atomen bzw. Molekülen des Fluoreszenzmarkers 21 absorbiert werden und diese so in
5 einen angeregten Energiezustand versetzen. Dieser Energiezustand wird dann unter Aussendung der Fluoreszenzphotonen ν_F , die eine für den Marker charakteristische Wellenlänge aufweisen, wieder abgebaut.

Aus den in ein zugehöriges Mikroskop 10 eintretenden Fluoreszenzphotonen ν_F wird
10 vom optischen System des Mikroskops eine Abbildung der Intensitätsverteilung der Fluoreszenzstrahlung erzeugt. Auf dieser Abbildung kann ein Beobachter zum Beispiel Bereiche erhöhter Konzentration des Fluoreszenzmarkers mit dem Auge erkennen. Darüber hinaus wird bei fortgeschrittenen Auswertungsmethoden in der Regel die Intensitätsverteilung der Fluoreszenzstrahlung quantitativ vermessen. Gemeinsam ist
15 allen bekannten Fluoreszenz-Mikroskopiereinrichtungen, die nach dem bis hierher beschriebenen Prinzip arbeiten, dass das optische Auflösungsvermögen auf Werte von ca. 100 bis 30 nm begrenzt ist.

Um diese Beschränkung zu überwinden, wird bei der in der Figur dargestellten
20 Einrichtung vorgeschlagen, einen magnetisch sensitiven Fluoreszenzmarker 21 sowie ein räumlich inhomogenes magnetisches Feld 33 innerhalb der Probe 20 zu verwenden. Magnetisch sensitive Fluoreszenzmarker verändern ihr Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der Stärke des äußeren magnetischen Feldes, in dem sie sich befinden. Typische Beispiele für derartige Fluoreszenzmarker sind die sogenannten
25 "Exciplexe", die aus angeregten Komplexen gebildet werden. Das heißt, dass ein Molekül durch ein Primärphoton in einen angeregten Zustand übergeht und sich mit einem anderen Molekül unter Ausbildung eines Dimers verbindet. In dem Dimer sind die Energieniveaus des Singulett- und des Triplett-Zustandes nahezu degeneriert und

vermischen sich im Laufe der Zeit. Falls ein externes Magnetfeld angewendet wird, spaltet sich der Triplett-Zustand in drei verschiedene Zustände auf, wodurch die Geschwindigkeit der Mischung von Singulett- und Triplett-Zuständen verändert wird. Das Exciplex kann unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand
5 übergehen, wobei die Wahrscheinlichkeit der Emission dieses Photons davon abhängt, ob ein Singulett- oder Triplett-Zustand vorlag. Auf diese Weise hängt die Fluoreszenzausbeute auch vom äußeren Magnetfeld ab. Die Änderung der Fluoreszenz durch das Magnetfeld kann dabei mehr als 30% betragen, und es können bereits mit Feldern von weniger als 2 mT Effekte erzielt werden. Idealerweise sind die zwei
10 Reaktionspartner des Exciplexes unter Ausbildung eines sogenannten intramolekularen Exciplexes chemisch miteinander verbunden. Beispiele für magnetisch sensitive Fluoreszenzmarker sind auch aus Untersuchungen zur MARY (MAGnetic field effect on Reaction Yield) Spektroskopie bekannt (vgl. Günter Grampp et al.: RIEKEN Review No 44 (Februar 2002)). Ferner kann diesbezüglich auf die Publikationen von N.Kh.
15 Petrov verwiesen werden (z.B.: N.Kh. Petrov, V.N. Borisenko, A.V. Starostin, M.V. Alfimov, Amplification of the cage effect in binary solvents detected by technique of magnetic modulation of exciplex fluorescence, Izv. AN SSSR, ser. chim., 1991, no 11, p. 2456; N.Kh. Petrov, V.N. Borisenko, A.V. Starostin, M.V. Alfimov, Polar molecular clusters produced upon photoinduced electron transfer in an intermolecular exciplex in
20 binary solvents, J. Phys. Chem., 1992, vol. 96, no. 7, p.2901; N.Kh. Petrov, V.N. Borisenko, M.V. Alfimov, Study of preferential solvation in binary solvent mixtures by the fluorescence-detected magnetic field effect. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1994, vol. 90, no. 1, 109-111; N.Kh. Petrov, V.N. Borisenko, M. V. Alfimov, Magnetic Field Effects of Exciplex fluorescence of the PYrene-Azacrown Ether System in the Presence
25 of Alkali and Alkaline Earth Salts, J.Chem.Soc. Mendeleev Commun. 1995; N.Kh. Petrov, V.N. Borisenko, M.V. Alfimov, T. Fiebig, H. Staerk, Fluorescence-detected Magnetic Field Effects in Exciplex Systems Containing Azacrown Ethers as Electron Donor, J. Phys. chem., 1996, vol. 100, no. 16, 6368-6370.

Anstelle magnetisch sensitiver Fluoreszenzmarker könnten auch elektrisch sensitive Fluoreszenzmarker verwendet werden. Diese zeichnen sich entsprechend dadurch aus, dass ihr Fluoreszenzverhalten vom äußeren elektrischen Feld abhängt, in welchem sie sich befinden. Nachweisbare Änderungen des Fluoreszenzverhaltens treten oft schon
5 bei Unterschieden in der elektrischen Feldstärke in der Größenordnung von 10^6 V/m auf. Elektrisch sensitive Fluoreszenzmarker werden auch zur Messung von natürlich auftretenden elektrischen Feldstärken (z.B. innerhalb einer Zellmembran) verwendet. Für diesen Zweck werden elektrisch sensitive Fluoreszenzmarker beispielsweise in der US 2002/0155520 A9 beschrieben, wobei die dortigen Marker auch vorliegend
10 einsetzbar sind und wobei das Dokument durch Bezugnahme vollständig in die vorliegende Anmeldung aufgenommen wird. Ferner sei stellvertretend für weitere Veröffentlichungen zu diesem Thema auf Jian-young Wu et al., Histochemical Journal, 30 169-187 (1998) hingewiesen. Festzuhalten bleibt, dass das nachfolgend für
15 magnetisch sensitive Fluoreszenzmarker beschriebene Verfahren analog auch für elektrisch sensitive Marker ausgeführt werden kann.

Um die Sensitivität des Fluoreszenzmarkers 21 für magnetische Felder ausnutzen zu können, wird in der Nähe der Probe 20 ein Feldgenerator 30 positioniert, welcher ein
20 inhomogenes magnetisches Feld 33 innerhalb der Probe 20 erzeugen kann. Im dargestellten Beispiel besteht der Feldgenerator 30 aus drei (z.B. permanent-magnetischen) Polkörpern. Ein erster Polkörper 31 mit der Polarität "magnetisch Nord" hat vorzugsweise eine Spitze, um die optische Zugänglichkeit zur Probe zu verbessern. Auf gegenüberliegenden Seiten des ersten Polkörpers 31 sind zwei weitere Polkörper 32
25 mit der Polarität "magnetisch Süd" angeordnet. Diese können den ersten Polkörper 31 auch ringförmig umgeben. Wie durch gestrichelte Feldlinien 33 angedeutet ist, entsteht bei dieser Konstellation ein Fokusbereich 22 vor der Spitze des ersten Polkörpers 31, in welchem die magnetische Feldstärke in etwa Null ist. Der Abstand der Spitze zum Fokusbereich 22 hängt vom gewünschtem Gradienten ab und liegt typischerweise für

Gradienten von 10^6 T/m bei ca. 1 μ m bzw. für Gradienten von 10^3 T/m im Millimeterbereich. Die Breite des Fokusbereiches kann beispielsweise ca. 1nm betragen. Des Weiteren wird der Feldgenerator 30 so dimensioniert, dass der Gradient des Magnetfeldes 33 um den Fokusbereich 22 herum mehr als 10^6 T/m beträgt (bei
5 einem inhomogenen elektrischen Feld sollte der Gradient mehr als 10^{15} V/m² betragen).

In der Figur ist oberhalb der Mikroskopiereinrichtung die Verteilung der Intensität I_F der Fluoreszenzstrahlung v_F aus der Probe 20 über dem Ort x dargestellt. Dabei wird im Beispielfall angenommen, dass der Fluoreszenzmarker 21 etwa gleichförmig in der
10 Probe 20 verteilt ist, so dass im Prinzip alle Stellen mit gleicher Intensität Fluoreszenzstrahlung abgeben. Ausgenommen ist hiervon allerdings der kleine Fokusbereich 22 des inhomogenen Magnetfeldes 33, in dem die Intensität verringert ist. An der zugehörigen Stelle x_0 zeigt die Intensitätsverteilung I_F somit ein Minimum. Aufgrund des begrenzten optischen Auflösungsvermögens des Mikroskops 10 lässt sich das Minimum allerdings
15 nicht direkt scharf abbilden. Der mit der Mikroskopiereinrichtung beobachtete Verlauf der Fluoreszenzintensität I_{FM} hat vielmehr den im oberen Diagramm der Figur dargestellten Verlauf, bei welchem das Minimum entsprechend verbreitert und abgeflacht ist. Diese "verschmierte" Abbildung eines Fokusbereiches 22 kann dennoch für eine Verbesserung des Auflösungsvermögens der Mikroskopiereinrichtung
20 verwendet werden, da sich die Lage des inhomogenen Magnetfeldes 33 und damit des Fokusbereiches 22 innerhalb der Probe 20 variieren lässt. Durch die gleichzeitige Beobachtung der Veränderungen der gemessenen Intensitätsverteilung I_{FM} kann dann mathematisch auf die Verhältnisse im lokal begrenzten Bereich 22 rückgeschlossen werden. Im Ergebnis kann somit durch die Bewegung des Fokusbereiches 22 die
25 Konzentration des Fluoreszenzmarkers mit einer Auflösung im Nanometerbereich abgetastet werden.

Um die mit der Mikroskopiereinrichtung erreichbare Abbildungsgüte zu optimieren, sollte vorzugsweise der Anteil an Hintergrundstrahlung minimiert und somit das Signal-

Rausch-Verhältnis maximiert werden. Ein Weg hierfür besteht in der Anregung nur einer kleinen Probenregion durch Primärstrahlung ν_E sowie in der Beschränkung der Beobachtung auf eine entsprechend kleine Region. Idealerweise wird daher ein qualitativ hochwertiges konfokales Scanning-Mikroskop verwendet. Ferner sind

5 Techniken wie eine Zwei-Photonen-Anregung und eine stimulierte Emission hilfreich. Auch durch eine Integration über die Zeit und/oder ein hohes Lichtniveau für die Anregung kann das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Die Grenze besteht diesbezüglich im Fotobleichen der Fluoreszenzmarker. Ebenso wie alle vorstehend genannten können allgemein auch die zahlreichen anderen aus der Fluoreszenz-

10 mikroskopie bekannten Techniken in Kombination mit dem vorliegenden Verfahren eingesetzt werden.

Des Weiteren kann es sein, dass die Fluoreszenzmarker 21 im Laufe der Zeit durch chemische Reaktionen der angeregten Zustände (zum Beispiel mit Sauerstoff)

15 degenerieren. In diesem Falle werden die degenerierten Markermoleküle vorzugsweise im Wege der Diffusion ersetzt. Wenn zum Beispiel die Oberfläche einer Probe beobachtet werden soll, kann diese in eine Lösung des Fluoreszenzmarkers eingetaucht werden. Die Moleküle des Fluoreszenzmarkers absorbieren dann an der Oberfläche der Probe, wobei degenerierte Moleküle von Zeit zu Zeit durch unverbrauchte Moleküle des

20 Fluoreszenzmarkers aus der Lösung ersetzt werden.

Die beschriebene Mikroskopiereinrichtung kann ähnlich, wie es derzeit beim elektronenmikroskopischen Scannen geschieht, bei der Abbildung von Festkörpern eingesetzt werden. Vorteilhaft bei der oben beschriebenen, auf einem Magnetfeld

25 basierenden Methode ist dabei, dass die Probe nicht getrocknet werden muss und biologische Proben sogar noch lebend sein können. Falls ein elektrisches Feld verwendet wird, sollte die Probe elektrisch isoliert sein. Dies kann beispielsweise durch ihre Lagerung in Öl oder demineralisiertem Wasser oder durch Einfrieren erreicht werden.

Des Weiteren kann das Verfahren beim Nachweis biologischer Moleküle eingesetzt werden. Eine Probe verschiedener Moleküle könnte dabei mit Fluoreszenzmarkern (einer oder mehrerer Farben) gemischt werden, welche sich spezifisch oder unspezifisch an die zu identifizierenden Moleküle binden. Die Identifikation der Moleküle würde
5 dann über die beobachtete räumliche Verteilung der Fluoreszenzmarker erfolgen. Bei einer unspezifischen Bindung des Fluoreszenzmarkers an die Moleküle könnten große Moleküle z.B. dadurch identifiziert werden, dass der Fluoreszenzmarker sich an verschiedenen Stellen des Moleküls bindet und daher die charakteristische räumliche Form des Moleküls erkennbar macht. Bei der spezifischen Bindung von Fluoreszenz-
10 markern könnte das Verfahren z.B. eine schnelle Segmentierung einer DNA-Probe ermöglichen, wobei verschiedene Farben unterschiedliche Nukleotide kodieren könnten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mikroskopiereinrichtung zur Abbildung einer Probe (20), die einen magnetisch und/oder elektrisch sensitiven Fluoreszenzmarker (21) enthält, umfassend
 - ein Fluoreszenzmikroskop (10) zur Anregung und Abbildung von Fluoreszenzstrahlung (v_F) aus der Probe (20);
 - 5 - einen Feldgenerator (30) zur Erzeugung eines inhomogenen magnetischen und/oder inhomogenen elektrischen Feldes (33) in der Probe (20).
2. Mikroskopiereinrichtung nach Anspruch 1, welche dazu eingerichtet ist, das inhomogene Feld (33) innerhalb der Probe (20) in definierter Weise zu verändern.
- 10 3. Mikroskopiereinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Feldgenerator (30) zur Erzeugung eines inhomogenen Feldes (33) einen ersten Polkörper (31) mit einer ersten Polarität (N) aufweist, welcher an mindestens zwei gegenüberliegenden Seiten zweiten Polkörpern (32) anderer Polarität (S) benachbart ist.
- 15 4. Mikroskopiereinrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Datenverarbeitungseinrichtung zur Bildverarbeitung der mit dem Fluoreszenzmikroskop (10) aufgenommenen Abbildung (I_{FM}) enthält, welche dazu eingerichtet ist, aus dem bekannten räumlichen Verlauf des inhomogenen Feldes (33) während einer
- 20 oder vorzugsweise mehrerer Aufnahmen die Verteilung des Fluoreszenzmarkers (21) in der Probe (20) zu rekonstruieren.
5. Verfahren zur Ermittlung der räumlichen Verteilung eines magnetisch und/oder elektrisch sensitiven Fluoreszenzmarkers (21) in einer Probe (20), umfassend die

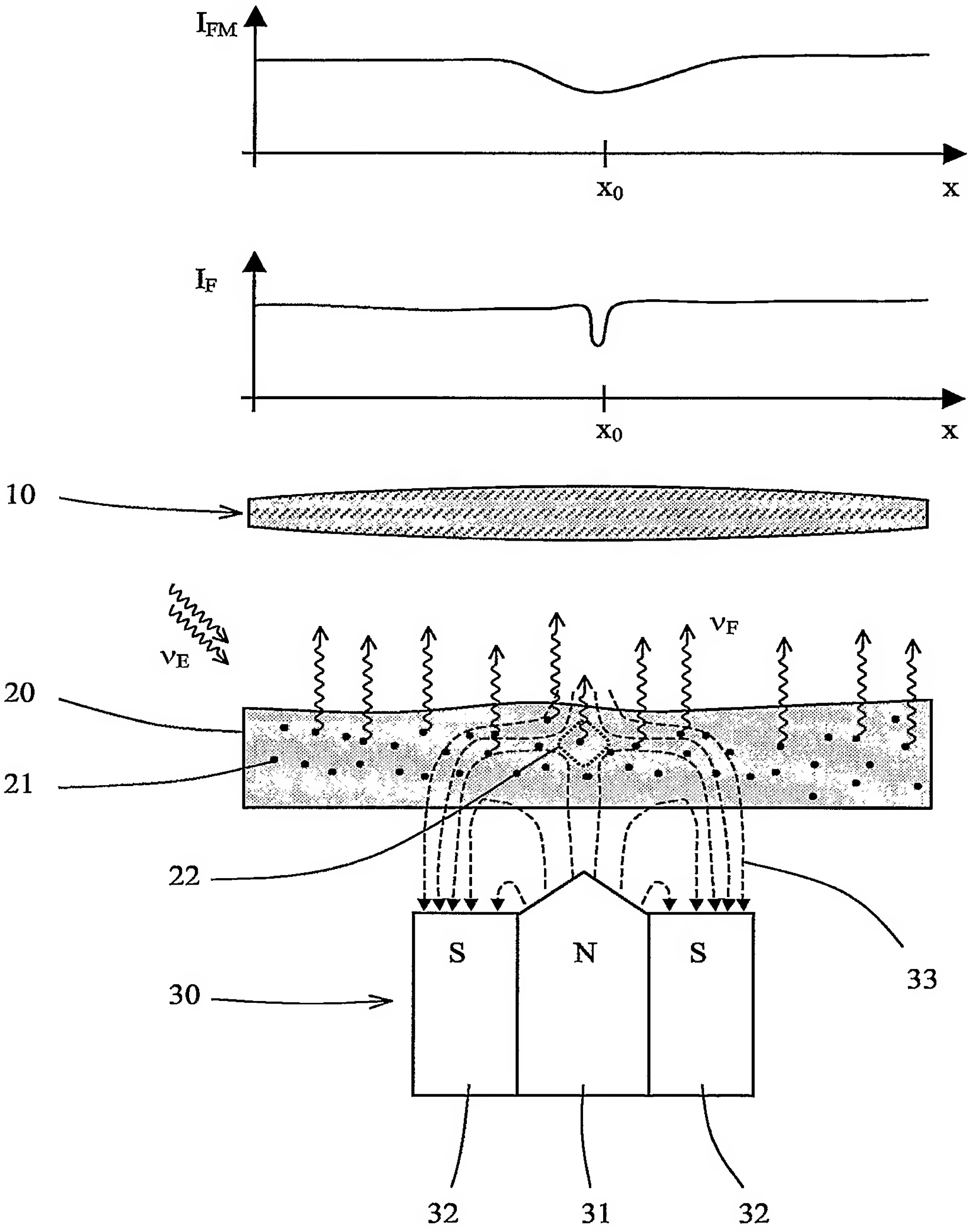
Schritte:

- Erzeugung eines inhomogenen magnetischen und/oder inhomogenen elektrischen Feldes (33) in der Probe (20);
 - Anregung von Fluoreszenzstrahlung (v_F) in der Probe (20);
 - 5 - Erzeugung einer Abbildung (I_{FM}) der Fluoreszenzstrahlung (v_F) aus der Probe (20) mit einem Fluoreszenzmikroskop (10);
 - Berechnung der räumlichen Verteilung des Fluoreszenzmarkers (21) mit Hilfe der erzeugten Abbildung (I_{FM}) und dem bekannten Verlauf des Feldes (33).
- 10 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das inhomogene magnetische Feld (33) einen Gradienten von mindestens 10^2 T/m, vorzugsweise mindestens 10^6 T/m hat.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das inhomogene elektrische Feld einen Gradienten von mindestens 10^{11} V/m², vorzugsweise mindestens 10^{15} V/m² hat.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das inhomogene Feld (33) ein lokales Minimum (22) der Feldstärke hat, insbesondere einen feldfreien Punkt oder Bereich.
- 25 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Breite des lokalen Minimums (22) kleiner als das optische Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskops (10) ist.
10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Probe (20) in einer Lösung mit dem Fluoreszenzmarker befindet.

ZUSAMMENFASSUNG

Fluoreszenz-Mikroskopiereinrichtung

Die Erfindung betrifft eine Mikroskopiereinrichtung und ein Verfahren, mit denen die räumliche Verteilung eines magnetisch und/oder elektrisch sensitiven Fluoreszenzmarkes (21) in einer Probe (20) ermittelt werden kann. Fluoreszenzstrahlung (ν_F) wird durch Primärstrahlung (ν_E) in der Probe (20) angeregt und von einem Mikroskop (10) abgebildet. Dabei wird innerhalb der Probe (20) ein räumlich inhomogenes Magnetfeld (33) erzeugt, welches zum Beispiel einen kleinen Fokusbereich (22) mit minimaler Feldstärke aufweist. Die Emission von Fluoreszenzstrahlung ist im Fokusbereich (22) lokal verändert, was sich in der gemessenen Intensitätsverteilung (I_{FM}) beobachten lässt. Auf diese Weise kann die Verteilung des Fluoreszenzmarkers (21) auch in Bereichen (22) mit einer Größe unterhalb des optischen Auflösungsvermögens des Mikroskops (10) rekonstruiert werden.



PCT/IB2005/050354

